

Schnelle Isolierung von RNA, DNA und Proteinen mit dem Lumizol-Reagenz

Lumizol Reagent wurde für die schnelle Isolierung von RNA, DNA und Proteinen aus Zell- und Gewebeproben unterschiedlicher Herkunft (Pflanzen, Tiere, Bakterien und Hefen) entwickelt.

Lumizol Reagent ist eine Lösung, die Phenol, Guanidinisothiocyanat und andere Komponenten enthält, die für die Isolierung hochwertiger Nucleinsäuren und Proteine erforderlich sind. Phenol und Guanidinisothiocyanat sorgen für Zellyse und hemmen wirksam Ribonukleasen, wodurch die RNA intakt bleibt. Nach Homogenisierung und Zugabe von Chloroform trennt sich die Probe in eine obere wässrige Phase, Interphase und untere organische Phase. Die RNA kann mit Isopropanol aus der oberen Phase präzipitiert werden, während die DNA und Proteine mit Ethanol bzw. Isopropanol aus der Interphase und der unteren organischen Phase präzipitiert werden können.

Proben für die RNA-, DNA- und Proteinisolierung:

- Pflanzen- und Tiergewebe — 30–100 mg;
- anhaftende eukaryotische Zellen — 1×10^5 to 1×10^7 ;
- Suspension eukaryotischer Zellen, Hefe — 5×10^6 to 10×10^6 ;
- Bakterienzellen — 1×10^7 .

RNA-Isolierung

Verwenden Sie für die beste RNA-Isolierung frische oder in flüssigem Stickstoff schockgefrorene Proben. Lassen Sie die Proben vor der Homogenisierung in Lumizol Reagent nicht auftauen.

1. Lysieren Sie die Proben in Lumizol Reagent entsprechend Ihrem Ausgangsmaterial:
 - *Gewebe*: Die Gewebeprobe in 1 ml Lumizol-Reagenz homogenisieren und das Homogenat in ein neues 1,5-ml-Röhrchen überführen.
 - *Zellen*: Verwerfen Sie das Medium, resuspendieren Sie das Zellpellet oder die Monoschicht mit 0,5–1 ml Lumizol-Reagenz und übertragen Sie das Lysat in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.
2. *(Optional)* Wenn die Probe einen hohen Fettgehalt hat, zentrifugieren Sie das Lysat bei $12.000 \times g$ für 5 min bei 4°C und überführen Sie den Überstand in ein neues 1,5-ml-Röhrchen.
3. Inkubieren Sie das Röhrchen für 5 min bei Raumtemperatur.
4. Fügen Sie dem Lysat 0,2 ml Chloroform hinzu (pro 1 ml Lumizol-Reagenz, das für die Lyse verwendet wird), mischen Sie gründlich, indem Sie das Röhrchen umdrehen, und inkubieren Sie es 2 Minuten lang bei Raumtemperatur.
5. Zentrifugieren Sie das Röhrchen bei $12.000 \times g$ für 15 min bei 4°C . Nach dem Zentrifugieren trennt sich das Gemisch in zwei Phasen: eine farblose wässrige Phase und eine gelbe organische Phase, zwischen denen sich eine Zwischenphase befindet.
6. Überführen Sie die obere wässrige Phase in ein neues 1,5-ml-Röhrchen, ohne die Zwischenphase zu berühren. Wenn die

RNA-Menge in der Probe sehr gering ist, fügen Sie der wässrigen Phase ein Kopräzipitat hinzu. Bewahren Sie die organische Phase und die Interphase für die DNA- und Proteinextraktion auf.

7. 0,8 Volumina Isopropanol zur wässrigen Phase geben, gründlich mischen und 10 min bei Raumtemperatur inkubieren.
8. Zentrifugieren Sie das Röhrchen bei $12.000 \times g$ für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
9. Verwerfen Sie den Überstand und fügen Sie 1 ml 70 % Ethanol zum RNA-Pellet hinzu, mischen Sie gründlich und zentrifugieren Sie das Röhrchen bei $7.500 \times g$ für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
10. Verwerfen Sie den Überstand und trocknen Sie das RNA-Pellet für 5–10 min an der Luft.
11. Lösen Sie das RNA-Pellet in 50–100 μl RNase-freiem Wasser auf.

DNA-Isolierung

1. Entfernen Sie alle verbleibenden wässrigen Phasen, die über der in Schritt 5 im Abschnitt «RNA-Isolierung» erhaltenen Interphase liegen.
2. Fügen Sie der Interphase und der organischen Phase 0,3 ml 100 %iges Ethanol hinzu (pro 1 ml Lumizol-Reagenz, das in Schritt 1 im Abschnitt «RNA-Isolierung» verwendet wurde), mischen Sie gründlich, indem Sie das Röhrchen umdrehen, und inkubieren Sie 2–3 Minuten lang bei Zimmertemperatur.
3. Zentrifugieren Sie das Röhrchen bei $2.000 \times g$ für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Übertragen Sie den Überstand in ein neues 1,5-ml-Röhrchen. Der Überstand kann für die anschließende Proteinextraktion verwendet werden.
4. Resuspendieren Sie das DNA-Pellet in 1 ml Natriumcitrat/Ethanol-Lösung (0,1 M Natriumcitrat in 10 % Ethanol, pH 8,5).
5. 30 Minuten inkubieren, dabei gelegentlich mischen.
6. Zentrifugieren Sie das Röhrchen bei $2.000 \times g$ für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Verwerfen Sie den Überstand.
7. Wiederholen Sie die Schritte 4–6 noch einmal.
8. Fügen Sie dem DNA-Pellet 1 ml 70 %iges Ethanol hinzu, mischen Sie gründlich und zentrifugieren Sie das Röhrchen bei $2.000 \times g$ für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
9. Verwerfen Sie den Überstand und trocknen Sie das DNA-Pellet für 5–10 min an der Luft.
10. Resuspendieren Sie das DNA-Pellet in 0,3–0,6 ml 8 mM Natriumhydroxid.
11. Zentrifugieren Sie das Röhrchen bei $12.000 \times g$ für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, überführen Sie den Überstand in ein neues 1,5-ml-Röhrchen und stellen Sie den pH-Wert mit Tris-HCl-Puffer auf 7–8 ein [fügen Sie 5 μl 1 M Tris-HCl-Puffer hinzu (pH 4,5) auf 300 μl DNA-Lösung].

Proteinisolierung

1. Geben Sie 1,5 ml Isopropanol zu dem in Schritt 3 im Abschnitt «DNA-Isolierung» erhaltenen Überstand (pro 1 ml Lumizol-Reagenz, das in Schritt 1 im Abschnitt «RNA-Isolierung» verwendet wurde), mischen Sie gründlich, indem Sie das Röhrchen umdrehen, und inkubieren Sie 10 min bei Raumtemperatur.
2. Zentrifugieren Sie das Röhrchen bei $12.000 \times g$ für 10 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Verwerfen Sie den Überstand.

3. Das Proteinpellet in 2 ml Guanidinhydrochlorid/Ethanol-Lösung (0,3 M Guanidinhydrochlorid in 95 % Ethanol) resuspendieren.
4. Inkubieren Sie das Röhrchen für 20 min bei Raumtemperatur.
5. Zentrifugieren Sie das Röhrchen bei $7.500 \times g$ für 5 min bei 4 °C. Verwerfen Sie den Überstand.
6. Wiederholen Sie die Schritte 3–5 noch zweimal.
7. Fügen Sie dem Proteinpellet 2 ml 100 % Ethanol hinzu, mischen Sie gründlich und inkubieren Sie 20 min bei Raumtemperatur.
8. Zentrifugieren Sie das Röhrchen bei $7.500 \times g$ für 5 min bei 4 °C. Verwerfen Sie den Überstand.
9. Das Proteinpellet 5–10 min an der Luft trocknen.
10. Lösen Sie das Proteinpellet in einem SDS-haltigen Puffer (z. B. einem Probenpuffer zum Auftragen von Proteinproben auf ein Polyacrylamidgel).

Lumiprobe Corporation

201 International Circle, Suite 135
Hunt Valley, Maryland 21030
USA
Phone: +1 888 973 6353
Fax: +1 888 973 6354
Email: order@lumiprobe.com

Lumiprobe GmbH

Feodor-Lynen-Strasse 23
30625 Hannover
Germany
Phone: +49 511 16596811
Fax: +49 511 16596815
Email: de@lumiprobe.com

Lumiprobe RUS Ltd

Kotsyubinsky street, 4
121351 Moscow
Russian Federation
Phone: +7 800 775 3271
Email: ru@lumiprobe.com